

DOI: 10.12264/JFSC2021-0295

DNA 条形码在鲷属鱼类物种鉴定和系统进化分析中的适用性

王开杰^{1,2}, 徐永江¹, 柳学周¹, 崔爱君¹, 姜燕¹, 王滨¹, 方璐¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室, 山东 青岛 266071;
2. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022

摘要: 为了探讨线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I、II (CO I、CO II) 和 16S rRNA 基因在鲷属鱼类物种鉴定和群体划分中的适用性, 在黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)等鲷属鱼类中克隆了 3 种基因, 并进行序列比对与系统进化分析。结果显示, CO I、CO II 和 16S rRNA 的基因序列均表现出明显的 A+T 偏倚性; 16S rRNA 序列最为保守, 变异率仅为 5.06%; CO I 序列的平均核苷酸差异数(k)和核酸多样性指数(P_i)高于 CO II 和 16S rRNA, CO II 的单倍型多样性指数最高, CO I 序列分化程度更高。比较了鲷属鱼类 3 种基因的扩增序列, 发现 CO I、CO II 和 16S rRNA 均能对我国分布的 3 种鲷属鱼类进行有效鉴别。另外, CO I、CO II 还可作为不同地理群体黄条鲷的鉴别 DNA 条形码, 而 16S rRNA 对于不同地理群体的黄条鲷识别能力不足。在鲷属鱼类中, 基于 CO I、CO II、16S rRNA 基因计算的种间遗传距离都大于种内遗传距离的 10 倍以上, 系统进化分析显示每个物种都形成单系, 表明 CO I、CO II、16S rRNA 基因不仅可作为鲷属鱼类物种鉴定和多样性保护的有效 DNA 条形码, CO I、CO II 还可作为黄条鲷不同地理种群划分和国际资源判别的依据。

关键词: 鲷属鱼类; DNA 条形码; 遗传距离; 系统进化树

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0171-13

2002 年, Tautz 等^[1]首次提出了 DNA 分类学的概念, 他认为将传统分类学与 DNA 序列结合起来, 利用 DNA 序列表现出的差异进行物种划分, 可克服传统形态学鉴别技术主观性强、要求样本个体完整性高等局限性, 具有重复性好、灵敏度高等优点^[2]。DNA 条形码(DNA barcode)最早由 Barrent 等^[3]提出, 是一种标准的、有足够变异的、易扩增且能够代表该物种的 DNA 短片段, 可广泛应用于物种鉴定和进化分析^[4], 并且具有所需组织块小、不受发育阶段限制、鉴定准确性高、操作简便、成本低、效率高等优势, 可快速鉴定

大量样本^[5]。与核 DNA 相比, 线粒体 DNA 具有长度短、含量丰富、偏母性遗传和进化速度快等特点^[6], 是物种分类、遗传多样性分析、进化分类和水产品鉴定等方面理想的分子标记^[7-8]。据不完全统计, 鱼类生命条形码计划已对已知的 3 万余种鱼类中 8000 种商业物种鱼类的细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I)进行了测定, 发现 CO I 条形码可以有效区分约 98%的海洋鱼类和 93%的淡水鱼类^[9]。

鲷是鲈形目(Perciformes)、鲷科(Carangidae)、鲷属(*Seriola*)鱼类的统称, 是一类栖息在海洋中

收稿日期: 2021-06-28; 修订日期: 2021-08-27.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900901, 2018YFD0901204); 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0303-1); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(TD47, 2021GH05); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022021011); 国家海洋水产种质资源库项目; 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-47).

作者简介: 王开杰(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类多样性评价与保护技术. E-mail: jasions@qq.com

通信作者: 徐永江, 研究员, 研究方向为海水鱼类繁育理论与技术. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

上层的暖温性大型鱼类,具有全球水域长距离洄游的特性,其个体大、生长快,特别适合深远海大型设施化养殖,是我国近年来发展深远海养殖的优良适养鱼类。鲷属鱼类全球共有 9 种^[10-11],且存在“同种异名”、“同种异形”的现象,现已查明在我国分布有 3 种,分别为黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)和五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)。三种鲷属鱼类在形态上具有相似的体色和条纹,利用传统的形态观察法难以准确判别,受精卵和苗种在形态上更难区分,为资源调查中种群判别等带来了较大困难。另外,作为一种全球分布且深受消费者喜爱的重要经济鱼类,鲷属鱼类种苗、受精卵、商品鱼的国际流通与贸易较为旺盛,为防止外来物种入侵事件发生以及肌肉品质的鉴定依据不足等问题发生^[12],亟需建立一种实用、快速、高效的鲷属鱼类物种鉴别方法。目前,国际上通用的 DNA 条形码中,CO I 在鱼类物种鉴定中的应用最为广泛^[13];Lakra 等^[14]利用 CO I 基因对印度洋水域 115 种鱼类进行了系统进化研究,结果表明 NJ 进化树上基于 CO I 序列得到的聚类与传统形态学分类相一致,并能清晰地反映这些鱼类的系统发育关系;CO II 基因序列较短,也被作为物种鉴定的条形码^[15-16];线粒体 16S rRNA 序列保守,变异率低,通常用于分析不同阶元的系统发育关系^[17]。本研究探讨了线粒体 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因在鲷属鱼类物种鉴定和群体划分中的适用性,以期鲷属鱼类物种鉴别、种群划分和种质资源保护及可持续利用提供技术支持,助力我国鲷养殖产业的持续健康发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国鲷属鱼类样品采集于福建宁德(26°62'N, 119°75'E),黄条鲷(*Seriola lalandi*, SL)、高体鲷(*Seriola dumerili*, SD)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*, SQ) 2 龄鱼各 3 尾,体重 2.93~4.20 kg。另外,采集了澳大利亚黄条鲷(*Seriola lalandi*, ASL)(33°44'S, 151°45'E)和日本黄条鲷(*Seriola lalandi*, JSL)(32°45'N, 128°27'E)野生群体样品各 2 尾。所有实验鱼用 MS222 麻醉后,取胸鳍放入无水乙醇中保存,用于基因组 DNA 的提取。采集的样本通过形态学方法进行分类确认,国际水域采集的黄条鲷样本通过采集者和图片资料确认。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取鳍条样品 20 mg,剪碎后置于离心管中,利用 TIANGEN 海洋动物组织 DNA 试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取 DNA,按照说明书进行操作。通过琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度,置于-20 ℃保存。

1.2.2 PCR 扩增 设计基因扩增引物 3 对,CO I 基因扩增采用 Ward 等^[18]的通用引物,根据序列比对设计 CO II 和 16S rRNA 基因扩增特异引物(表 1)。3 个基因的 PCR 扩增体系为 50 μL,包括 rTaq 酶 25 μL,模板 2 μL,正反向引物各 1 μL,ddH₂O 21 μL,PCR 扩增程序如表 2。

将 PCR 产物在 1.0%琼脂糖凝胶电泳并回收,连接到 T1-Simple 载体,在转化到大肠杆菌感受态细胞中之后涂布于培养皿中,在 37 ℃培养箱中

表 1 三种鲷线粒体 DNA 条形码 PCR 引物
Tab. 1 Mitochondrial DNA barcode PCR primers of three *Seriola* species

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	PCR 产物/bp PCR product
CO I	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	59	655
	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		
CO II	ATGGCACATCCCTCCCAACT	54	646
	AAGCGTCTTCAACTATTAGTGATGT		
16S rRNA	CTCCAAGACAGCCTAACAATA	53	750
	CGTGGTGCCATTTCATACAG		

表 2 本研究 3 种基因 PCR 扩增程序
Tab. 2 PCR amplification programs of three genes in the study

基因 gene	扩增条件 PCR amplification program				
	变性 initial denaturation	退火 annealing	72 °C 延伸 extension	循环数 cycles	最后延伸 final extension
CO I		59 °C, 40 s	60 s	36	72 °C 5 min
CO II	95 °C 5 min	54 °C, 50 s	60 s	38	4 °C Forever
16S rRNA		53 °C, 60 s	70 s	38	

倒置培养 12~16 h, 挑取单克隆菌落进行阳性检测, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 序列比对与建树分析 从 GenBank 数据库下载与本研究 3 种基因扩增区段一致的 15 种 5 属鲷科鱼类 CO I、CO II、16S rRNA 基因序列, 通过 BOLD 数据库对下载序列进行准确性验证, 同时在 FishBase 中检验种名的有效性, 最终采用的基因序列为 35 条。将得到的测序结果采用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 其中 CO I 基因在 BOLD (生命条形码数据系统 www.boldsystems.org)和中国重要渔业生物 DNA 条形码信息平台标准库(<http://www.fishery-barcode.cn>)中进行比对校验。采用 DnaSP5.10 软件进行遗传多样性参数分析, 包括单倍型数(h)、单倍型多样性指数(H_d)、核苷酸多样性指数(P_i)、平均核苷酸差异数(k)等。运用 Mega7.0 软件, 统计序列碱基组成, 计算序列保守位点(C-conserved sites)、简约信息位点(Parsimony-informative sites)和变异位点(V-variable

sites)等, 运用最大似然法(maximum likelihood, ML), 采用 Kimura 2-parameter 模型计算其遗传距离, 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

在三种鲷属鱼类的样本中均扩增出 3 个基因的目的片段, 共获得 65 条序列, 测序得到的片段大小为 655 bp (CO I)、646 bp (CO II)、750 bp (16S rRNA), 与预测结果一致。

三种鲷属鱼类的 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因片段中 T、C、A 和 G 平均含量见表 3。CO I 基因中 A+T 平均含量为 51.3%, 稍高于 G+C 平均含量(48.7%), 表现出 A+T 偏倚性; CO II 基因中 A+T 平均含量为 56.7%, 高于 G+C 平均含量(43.3%); 16S rRNA 基因中 A+T 平均含量为 51.6%, 稍高于 G+C 平均含量(48.4%); 3 种基因的 GC 平均含量在 43.4%~48.7%之间, 在不同鲷属鱼类间差异不显著, 其中 CO II 基因 GC 含量最低(43.3%), CO I 基因 GC

表 3 三种鲷 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因碱基组成
Tab. 3 Base composition of CO I、CO II and 16S rRNA genes in three *Seriola* species

组编号 group number	CO I 碱基含量 CO I base content				CO II 碱基含量 CO II base content				16S rRNA 碱基含量 16S rRNA base content			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
SL	28.2	29.2	23.1	19.5	28.3	26.3	28.9	16.4	20.4	26.4	30.9	22.3
JSL	28.2	29.2	23.2	19.4	28.2	26.4	28.9	16.5	20.4	26.4	30.9	22.3
ASL	28.1	29.0	23.3	19.6	28.1	26.7	28.3	16.9	20.5	26.5	30.8	22.2
SD	28.7	29.0	23.2	19.1	28.1	27.0	28.3	16.6	21.1	25.2	31.3	22.4
SQ	28.4	29.2	22.3	20.1	27.6	27.1	28.6	16.8	20.4	26.5	31.3	21.7
平均 average	28.3	29.1	23.0	19.6	28.1	26.7	28.6	16.6	20.6	26.2	31.0	22.2

注: SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SD 为高体鲷; SQ 为五条鲷。
Note: SL is *Seriola lalandi*; JSL is *Seriola lalandi* from Japan; ASL is *Seriola lalandi* from Australia; SD is *Seriola dumerili*; SQ is *Seriola quinqueradiata*.

含量最高(48.7%)。3 种基因均表现出 A+T 偏倚性。各密码子的碱基含量结果显示(表 4), CO I 序列中, 第 2 密码子位点 GC 含量(56.5%)高于第 1 和第 3 密码子位点(47.7%和 42.0%), 且第 1 密码子变异位点最低(23); CO II 序列中, 第 2 密码子位点 GC 含量(57.6%)显著高于第 1 和第 3 密码子位点(39.4%和 33.0%); 16S rRNA 序列中, 第 1 密码子位点 GC 含量(50.0%)略高于第 2 和第 3 密码子位点(48.5%和 46.3%), CO II (30)和 16S rRNA (20)的第 1 密码子变异位点最高, 碱基使用频率表现出明显 A+T 偏倚性。

三种鲷属鱼类遗传多样性参数统计见表 5。CO I 基因序列的变异率为 13.58%, 高于 CO II (12.22%)和 16S rRNA (5.06%); CO I 序列转换/颠换比 R 为 16.60, 远高于 CO II (6.78)和 16S rRNA (3.22)。16S rRNA 的保守位点所占比率为 94.93%, 是 3 种基因序列中最保守的, 表明其遗传物质稳定, 核苷酸变异低。从平均核苷酸差异数(k)和核酸多样性指数(P_i)来看, CO I 序列要高于 CO II 和 16S rRNA, 而 CO II 是三种基因中单倍型多样性指数最高的, 表明其遗传多样性较高, 且 CO I 序列分化程度更高。

表 4 三种鲷 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列片段各密码子碱基组成及变异位点
Tab. 4 The sequence composition and variation of CO I, CO II and 16S rRNA genes in three *Seriola* species

位点 site	CO I						CO II						16S rRNA					
	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V
第一位点 1st site	23.8	35.3	28.5	12.4	47.7	23	27.8	32.3	32.8	7.1	39.4	25	19.7	26.1	30.3	23.9	50.0	5
第二位点 2nd site	18.3	24.8	25.2	31.7	56.5	31	17.2	26.5	25.2	31.1	57.6	30	17.2	24.0	34.2	24.5	48.5	20
第三位点 3rd site	42.9	27.3	15.1	14.7	42.0	35	39.1	21.4	27.9	11.6	33.0	24	24.8	28.4	28.9	17.9	46.3	13

注: V 表示变异位点数。
Note: V indicates variable site number.

表 5 三种基因片段的遗传多样性参数
Tab. 5 Genetic diversity parameters of three gene fragments

基因 gene	序列长度 sequence length	遗传多样性参数 genetic diversity parameter							
		C	V	PI	R	h	H_d	k	P_i
CO I	655	566	89	88	16.60	9	0.913	32.585	0.04990
CO II	646	567	79	70	6.78	10	0.918	29.251	0.04528
16S rRNA	750	712	38	37	3.22	5	0.742	14.332	0.01961

注: C 为保守位点; V 为变异位点; PI 为简约信息位点; R 为转换/颠换比; h 为单倍型数; H_d 为单倍型多样性指数; k 为平均核苷酸差异数; P_i 为核苷酸多样性指数。
Note: C is conserved site; V is variable site; PI is parsimony-informative site; R is transitions/transversions ratio; h is number of haplotypes; H_d is haplotype diversity; k is average number of nucleoside difference; P_i is nucleotide diversity.

2.2 遗传距离分析

基于 CO I 基因, 依据 K_2P 模型计算得到鲷属鱼类 8 个物种和 4 种鲷亚科近缘属鱼类的种内与种间遗传距离(表 6)。结果显示, 种内遗传距离为 0.00~0.0046 (平均为 0.0013), 均低于 Hebert 等^[19]提出的最大种内距离为 0.02 的标准; 种间的平均遗传距离为 0.0785, 为种内平均遗传距离的 60 倍, 符合 Hebert 等^[19]提出的“10×规则”。中国和日本黄条鲷的平均遗传距离为 0.004, 而中国与澳大利亚黄条鲷的遗传距离为 0.022~0.025, 中国与智

利黄条鲷遗传距离为 0.029~0.031, 日本与澳大利亚黄条鲷遗传距离为 0.022, 可见, CO I 基因能够有效区分中国、日本与澳大利亚和智利黄条鲷群体。鲷属内, 高体鲷与几内亚鲷、斑纹鲷和环带鲷之间的遗传距离最大, 平均遗传距离为 0.13, 与长鳍鲷亲缘关系最近, 为 0.061; 黄条鲷与五条鲷遗传距离平均为 0.068, 亲缘关系最近。另外, 鲷属鱼类与其他 4 种鲷科鱼类之间的遗传距离均大于 0.14, 表明 CO I 基因还能用于鲷属鱼类与其他鲷科鱼类的区分。

表 6 基于 CO I 的遗传距离分析
Tab. 6 Genetic distance analysis based on CO I

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1																							
2	0.006																						
3	0.031	0.029																					
4	0.029	0.027	0.002																				
5	0.107	0.105	0.115	0.112																			
6	0.107	0.105	0.115	0.112	0.000																		
7	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110																	
8	0.029	0.027	0.006	0.004	0.112	0.112	0.002																
9	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110	0.000	0.002															
10	0.107	0.105	0.115	0.112	0.000	0.000	0.110	0.112	0.110														
11	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110	0.000	0.002	0.000	0.110													
12	0.004	0.002	0.027	0.025	0.103	0.103	0.023	0.025	0.023	0.103	0.023												
13	0.070	0.068	0.068	0.066	0.114	0.114	0.064	0.066	0.064	0.114	0.064	0.066											
14	0.070	0.068	0.068	0.066	0.114	0.114	0.064	0.066	0.064	0.114	0.064	0.066	0.000										
15	0.183	0.180	0.181	0.178	0.180	0.180	0.176	0.178	0.176	0.180	0.176	0.178	0.196	0.196									
16	0.202	0.199	0.205	0.202	0.202	0.202	0.199	0.202	0.199	0.202	0.199	0.197	0.199	0.199	0.163								
17	0.129	0.126	0.122	0.120	0.138	0.138	0.117	0.120	0.117	0.138	0.117	0.124	0.112	0.112	0.204	0.209							
18	0.087	0.085	0.085	0.083	0.103	0.103	0.081	0.083	0.081	0.103	0.081	0.083	0.083	0.165	0.176	0.103							
19	0.008	0.006	0.031	0.029	0.103	0.103	0.027	0.029	0.027	0.103	0.027	0.004	0.070	0.070	0.178	0.197	0.129	0.087					
20	0.068	0.066	0.070	0.068	0.107	0.107	0.066	0.068	0.066	0.107	0.066	0.064	0.006	0.006	0.196	0.199	0.110	0.076	0.068				
21	0.115	0.113	0.113	0.110	0.061	0.061	0.108	0.110	0.108	0.061	0.108	0.110	0.106	0.106	0.165	0.181	0.124	0.094	0.110	0.108			
22	0.165	0.163	0.171	0.168	0.173	0.173	0.165	0.168	0.165	0.173	0.165	0.160	0.148	0.148	0.197	0.210	0.171	0.150	0.155	0.141	0.173		
23	0.211	0.209	0.212	0.209	0.200	0.200	0.206	0.204	0.206	0.200	0.206	0.206	0.209	0.209	0.111	0.152	0.208	0.185	0.211	0.209	0.190	0.198	
24	0.105	0.103	0.117	0.115	0.134	0.134	0.113	0.115	0.113	0.134	0.113	0.101	0.110	0.110	0.165	0.184	0.092	0.081	0.101	0.103	0.117	0.155	0.180
25	0.098	0.096	0.101	0.098	0.126	0.126	0.096	0.098	0.096	0.126	0.096	0.094	0.100	0.100	0.199	0.195	0.131	0.103	0.094	0.096	0.124	0.142	0.193

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9 为中国黄条鲷(MH211123); 10 为日本高体鲷(AB517558); 11 为日本黄条鲷(AB517557); 12 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 13-14 为中国五条鲷; 15 为长身圆鲹(KF841444); 16 为乌鲹(KJ192332); 17 为几内亚鲷(KX512706); 18 为马鲷(EF609459); 19 为智利黄条鲷(KU312964); 20 为日本五条鲷(AB517556); 21 为长鳍鲷(KP347126); 22 为小甘鲹(KT591876); 23 为竹荚鱼(AB108498); 24 为斑纹鲷(DQ197998); 25 为环带鲷(MT455069).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumerili* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9. *Seriola lalandi* (MH211123) from China; 10. *Seriola dumerili* (AB517558); 11. *Seriola lalandi* (AB517557); 12. *Seriola lalandi* (LC597109); 13-14. *Seriola quinqueradiata* from China; 15. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 16. *Parastromateus niger* (KJ192332); 17. *Seriola carpenteri* (KX512706); 18. *Seriola hippos* (EF609459); 19. *Seriola lalandi* (KU312964); 20. *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 21. *Seriola rivoliana* (KP347126); 22. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 23 *Trachurus trachurus* (AB108498); 24. *Seriola fasciata* (DQ197998); 25. *Seriola zonata* (MT455069).

由表 7 可见, 基于 CO II 基因, 鲷属鱼类种内遗传距离为 0.00~0.006, 平均遗传距离为 0.003。属内种间遗传距离为 0.044~0.098, 平均遗传距离为 0.047, 为种内平均遗传距离的 16 倍, 其中黄条鲷与五条鲷遗传距离最小(0.044), 高体鲷和五条鲷遗传距离最大(0.098)。中国和日本种群的黄条鲷遗传距离较小(0.00~0.003), 中国与澳大利亚

黄条鲷遗传距离较大(0.025)。鲷属鱼类与其他鲷科鱼类比较发现, 小甘鲹(条鲷属)与鲷属鱼的亲缘关系较近, 二者之间遗传距为(0.041~0.069), 其中长身圆鲹与五条鲷的亲缘关系较远, 遗传距离最大, 为 0.180。表明 CO II 基因能有效将鲷属鱼类不同种区分, 还可用于鲷科鱼类属间高阶分类单元。

表 7 基于 CO II 的遗传距离分析
Tab. 7 Genetic distance analysis based on CO II

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1																		
2	0.003																	
3	0.025	0.025																
4	0.022	0.022	0.003															
5	0.085	0.085	0.078	0.076														
6	0.085	0.085	0.078	0.076	0.000													
7	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076												
8	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000											
9	0.052	0.052	0.049	0.045	0.098	0.098	0.045	0.045										
10	0.052	0.052	0.049	0.045	0.098	0.098	0.045	0.045	0.000									
11	0.187	0.185	0.189	0.185	0.168	0.168	0.185	0.185	0.182	0.182								
12	0.058	0.058	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.069	0.069	0.166							
13	0.171	0.169	0.169	0.169	0.175	0.175	0.169	0.169	0.172	0.172	0.142	0.174						
14	0.184	0.182	0.180	0.178	0.179	0.179	0.178	0.178	0.186	0.186	0.120	0.169	0.161					
15	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000	0.000	0.045	0.045	0.185	0.043	0.169	0.178				
16	0.083	0.083	0.076	0.074	0.002	0.002	0.074	0.074	0.096	0.096	0.166	0.041	0.173	0.176	0.074			
17	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000	0.000	0.045	0.045	0.185	0.043	0.169	0.178	0.000	0.074		
18	0.002	0.002	0.024	0.021	0.083	0.083	0.021	0.021	0.050	0.050	0.185	0.057	0.169	0.182	0.021	0.081	0.021	
19	0.062	0.062	0.069	0.066	0.057	0.057	0.066	0.066	0.082	0.082	0.173	0.058	0.165	0.172	0.066	0.055	0.066	0.060
20	0.048	0.048	0.045	0.042	0.094	0.094	0.042	0.042	0.003	0.003	0.180	0.066	0.170	0.188	0.042	0.092	0.042	0.047 0.078

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9-10 为中国五条鲷; 11 为竹荚鱼(AB108498); 12 为小甘鲷(KT591876); 13 为乌鲷(KJ192332); 14 为长身圆鲷(KF841444); 15 为中国黄条鲷(MH211123); 16 为日本高体鲷(AB517558); 17 为日本黄条鲷(AB517557); 18 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 19 为长鳍鲷(KP347126); 20 为日本五条鲷(AB517556).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumeril* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9-10. *Seriola quinqueradiata* from China; 11. *Trachurus trachurus* (AB108498); 12. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 13. *Parastromateus niger* (KJ192332); 14. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 15. *Seriola lalandi* (MH211123) from China; 16. *Seriola dumerili* (AB517558); 17. *Seriola lalandi* (AB517557); 18. *Seriola lalandi* (LC597109); 19. *Seriola rivoliana* (KP347126); 20. *Seriola quinqueradiata* (AB517556).

如表 8 所示, 基于 16S rRNA 基因, 鲷属鱼类种内遗传距离为 0.00~0.005, 4 种鲷属鱼类的遗传距离相差不大(小于 0.05); 种间的平均遗传距离为 0.0583, 为种内平均遗传距离的 19 倍; 除了鲷科鱼类中小甘鲷(条鲷属)与鲷属鱼类亲缘关系最近, 其他 3 种鲷科鱼类平均遗传距离都在 0.10 以上。基于 16S rRNA 计算, 中国与澳大利亚黄条鲷的遗传距离在 0.01 以内, 其对于不同地理群体的黄条鲷辨识力不足。

2.3 系统进化树分析

由图 1、图 2、图 3 可知, 基于 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列构建了鲷属鱼类与 4 种鲷

科鱼类的系统进化树, 发现可分为两个类群, 以鲷属鱼类和小甘鲷组成的一大类, 另一类则是以长身圆鲷、乌鲷和竹荚鱼组成。系统进化分析显示, 每个鱼种都聚为独立分支, 各物种均能得到有效区分且具有很高的支持度。同时, 其中基于 CO I、CO II 构建的进化树显示中国和日本黄条鲷聚为单系分支, 可有效区分中国、日本、澳大利亚和智利黄条鲷群体, 但基于 16S rRNA 的系统进化分析, 无法有效区分中国与澳大利亚黄条鲷群体。同时发现, 黄条鲷和五条鲷聚为一支, 高体鲷和长鳍鲷聚为一支, 表现出彼此相近的亲缘关系。在 CO II 基因进化树中, 小甘鲷与黄条鲷和五

表 8 基于 16S rRNA 的遗传距离分析
Tab. 8 Genetic distance analysis based on 16S rRNA

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																			
2	0.001																		
3	0.008	0.007																	
4	0.008	0.007	0.000																
5	0.036	0.035	0.036	0.036															
6	0.036	0.035	0.036	0.036	0.000														
7	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036													
8	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036	0.000												
9	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021											
10	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021	0.000										
11	0.056	0.058	0.058	0.058	0.062	0.062	0.058	0.058	0.059	0.059									
12	0.033	0.035	0.038	0.038	0.026	0.026	0.038	0.038	0.042	0.042	0.059								
13	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021	0.000	0.000	0.059	0.042							
14	0.001	0.002	0.010	0.010	0.035	0.035	0.010	0.010	0.019	0.019	0.055	0.032	0.019						
15	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036	0.000	0.000	0.021	0.021	0.058	0.038	0.021	0.010					
16	0.035	0.033	0.035	0.035	0.001	0.001	0.035	0.035	0.039	0.039	0.061	0.025	0.039	0.033	0.035				
17	0.010	0.010	0.001	0.001	0.038	0.038	0.001	0.001	0.022	0.022	0.056	0.039	0.022	0.011	0.001	0.036			
18	0.127	0.128	0.127	0.127	0.127	0.128	0.128	0.128	0.130	0.130	0.135	0.125	0.130	0.125	0.128	0.127	0.130		
19	0.157	0.157	0.154	0.154	0.151	0.151	0.154	0.154	0.155	0.155	0.155	0.149	0.155	0.157	0.154	0.151	0.152	0.090	
20	0.155	0.155	0.157	0.157	0.147	0.147	0.155	0.155	0.150	0.150	0.146	0.145	0.150	0.153	0.155	0.145	0.153	0.084	0.058

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9-10 为中国五条鲷; 11 为小甘鲷(KT591876); 12 为长鳍鲷(KP347126); 13 为日本五条鲷(AB517556); 14 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 15 为日本黄条鲷(AB517557); 16 为日本高体鲷(AB517558); 17 为中国黄条鲷(MH211123); 18 为乌鲂(KJ192332); 19 为长身圆鲂(KF841444); 20 为竹荚鱼(AB108498).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumerili* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9-10. *Seriola quinqueradiata* from China; 11. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 12. *Seriola rivoliana* (KP347126); 13. *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 14. *Seriola lalandi* (LC597109); 15. *Seriola lalandi* (AB517557); 16. *Seriola dumerili* (AB517558); 17. *Seriola lalandi* (MH211123); 18. *Parastromateus niger* (KJ192332); 19. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 20. *Trachurus trachurus* (AB108498).

条鲷亲缘关系更近一步。16S rRNA 基因序列较 CO I 和 CO II 分化程度较低, 遗传差异较小。综上所述, 基于 3 种基因所建的 ML 进化树对鲷属鱼类的不同鱼种具有准确的辨识力。

3 讨论

DNA 作为生物的遗传信息载体, 含有丰富的多态性信息, 受外界因素的影响较小, 使其能够准确地反映物种间的遗传关系, 随着线粒体 DNA 研究的不断深入, 其作为分子标记被广泛应用于不同鱼类种群系统发育分析中^[20]。线粒体基因组中不同蛋白编码基因的进化速率是不同的, 各基

因所传递的遗传信息量也不同^[21], 根据研究需要, 选择合适的分子标记位点进行分析。本研究共分析了 CO I、CO II 与 16S rRNA 三个线粒体基因在鲷属鱼类物种以及不同地理种群黄条鲷鉴别方面的应用, 结果表明其对鲷属鱼类的物种判别方面具有较好的适用性, 但 16S rRNA 在黄条鲷地理种群水平层面的鉴别能力不足。因此, 利用 2 个或 3 个基因序列可以提升 DNA 条形码技术在鲷属鱼类群体鉴别、种质资源多样性保护与利用方面的可靠性。

CO I 基因是最早且目前应用最为广泛的 DNA 条形码, 具有丰富的遗传变异信息, 在鱼类

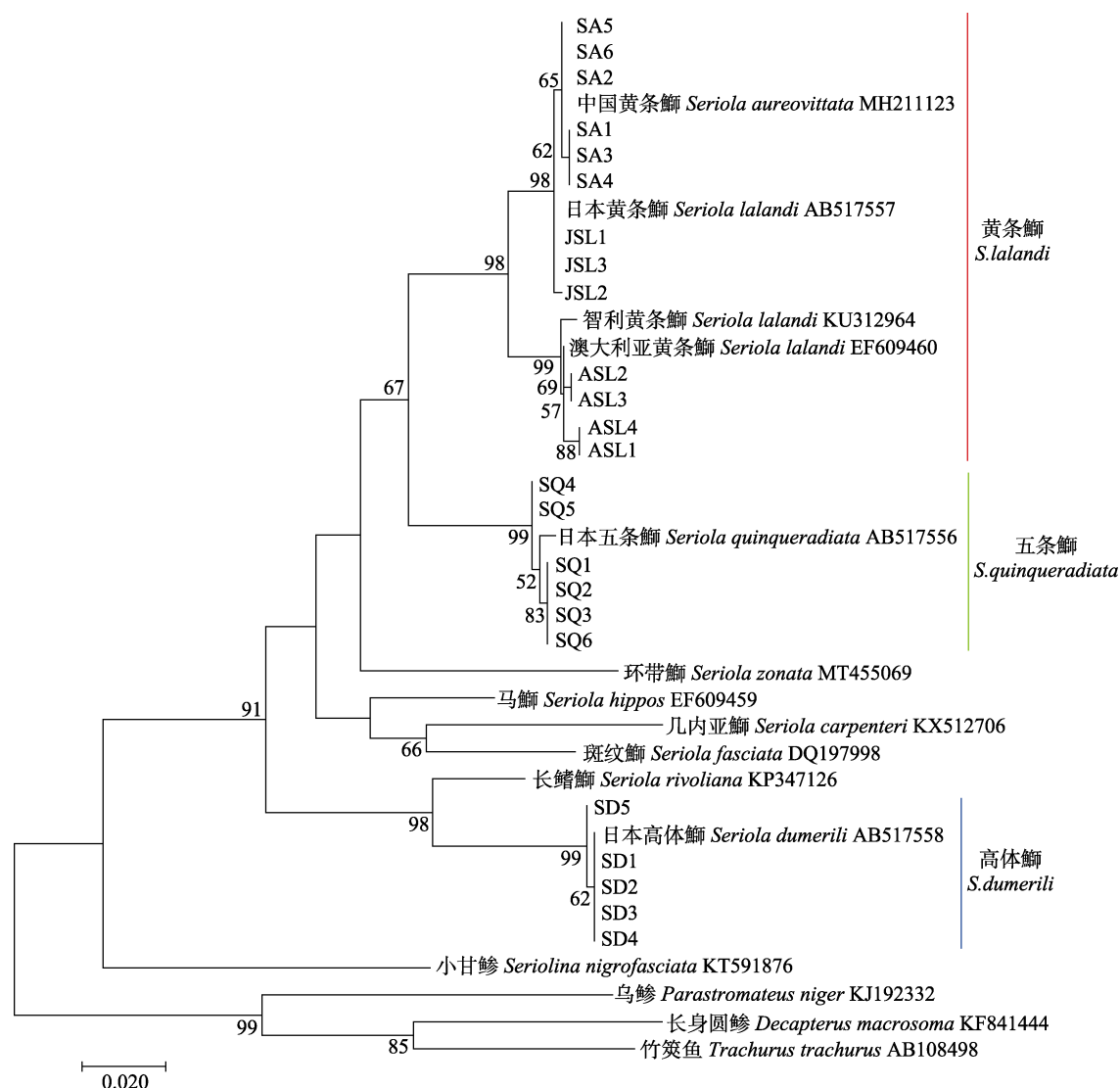


图 1 基于 CO I 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鰺; JSL 为日本黄条鰺; ASL 为澳大利亚黄条鰺; SQ 为中国五条鰺; SD 为中国高体鰺。节点处数字为置信度值。

Fig. 1 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on CO I gene

SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia;

SQ represents *Seriola quinquerradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.

The number on branch is confidence value.

的物种鉴定和系统进化发育研究领域取得了诸多进展^[22]。同 CO I 基因一样, CO II 也具有进化信息位点多、易扩增且相对较短的特点,也是一种理想的 DNA 分子标记。对昆虫的研究表明, CO II 基因在对属内不同种、种内不同亚种或不同地理区域之间的物种鉴定方面,是一种非常有效的分子标记^[23-24]。另外, 16S rRNA 基因序列相对保守, 也具备条形码的准则, 通常作用于种以上的分类阶元进行物种鉴定, 在鲷形目鱼类^[25]和石斑鱼^[26]分类鉴定与系统进化分析中已经得到广泛的应

用。在本研究中, 基于 CO I 基因分析, 三种鲷属鱼类的平均碱基含量为(T: 28.3, C: 29.1, A: 23.0, G: 19.6), AT 平均含量(51.3%)显著高于 GC 平均含量(48.7%); 其中, CO I 基因第二密码子位点 GC 含量最高(56.5%), 第三密码子位点 GC 含量最低(42.0%), 表现明显的 AT 偏倚性, 与柳淑芳等^[27]研究结果一致; Ward 等^[28]报道了硬骨鱼中 CO I 基因第一密码子 GC 含量最高, 第三密码子 GC 含量最低; 姜郦轩等^[29]分析了南极鱼亚目 CO I 基因的第一密码子 GC 含量最高, 第二密码子 GC

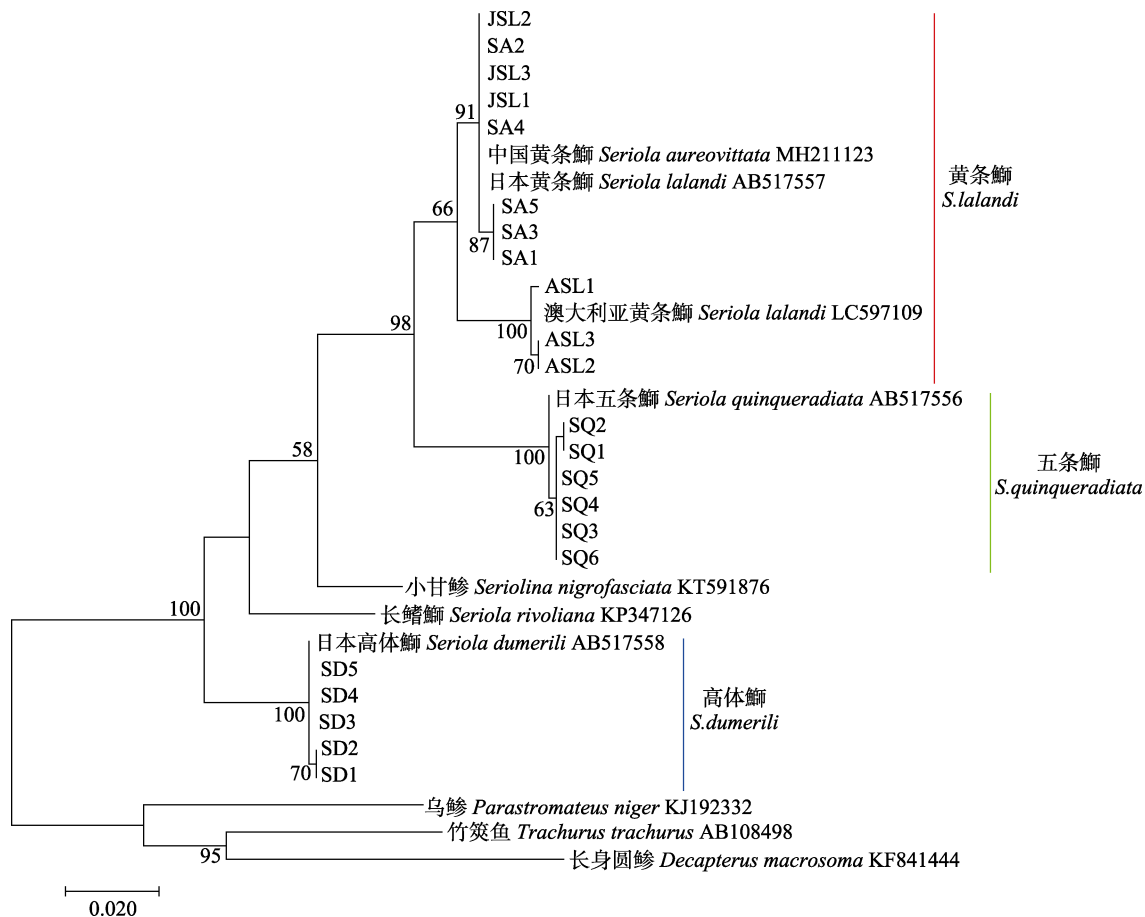


图 2 基于 CO II 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SQ 为中国五条鲷; SD 为中国高体鲷。节点处数字为置信度值。
Fig. 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on CO II gene
SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia;
SQ represents *Seriola quinqueradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.
The number on branch is confidence value.

含量最低。以上研究表明,不同类群鱼种其 CO I 基因碱基组成不同,GC 向 AT 进化过程中具有选择压力。本研究结果显示,三种基因序列中的转换频率均高于颠换,CO I 基因转换与颠换比值 R 平均为 16.60,远大于 CO II (6.78)、16S rRNA (3.22),由于 R 值大于 2.0,表明三种基因序列的突变均未达到饱和,在物种进化中还存在着巨大的进化潜能^[30]。

本研究发现基于 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因分析的鲷属鱼类种间遗传距离均低于 0.02 的标准,种间的平均遗传距离为种内平均遗传距离的 16 倍以上,符合 Hebert 等^[19]提出的“10×规则”,因此均可作为鲷属鱼类物种鉴别的 DNA 条形码。本研究还构建了鲷科鱼类 5 属 15 种鱼类系统进化

树,结果显示每个物种都独立分支,单系性得到了很好的支持。其中,鲷属鱼类与小甘鲷聚为一支,遗传距离较近,黄条鲷与五条鲷遗传距离最小,亲缘关系最近,这与郑文娟等^[31]对 12 种鲷科鱼类进行系统发育分析的结果一致;鲷属鱼类中 CO I 序列的平均种间遗传距离与种内平均遗传距离的比值远大于 CO II 和 16S rRNA,表明 CO I 序列比其他序列拥有更多的系统发育信息,更适合解析亲缘关系密切的分类类群^[32]。CO I、CO II 基因不仅能有效辨识几种鲷属鱼类之间的亲缘关系,还可用于鲷科鱼类不同属间的鉴别,为鲷科鱼类高阶分类单元的确定提供参考。基于 16S rRNA 计算的鲷属鱼类在进化时间上基本相似,遗传差异不显著,可能是由于所研究物种不同组

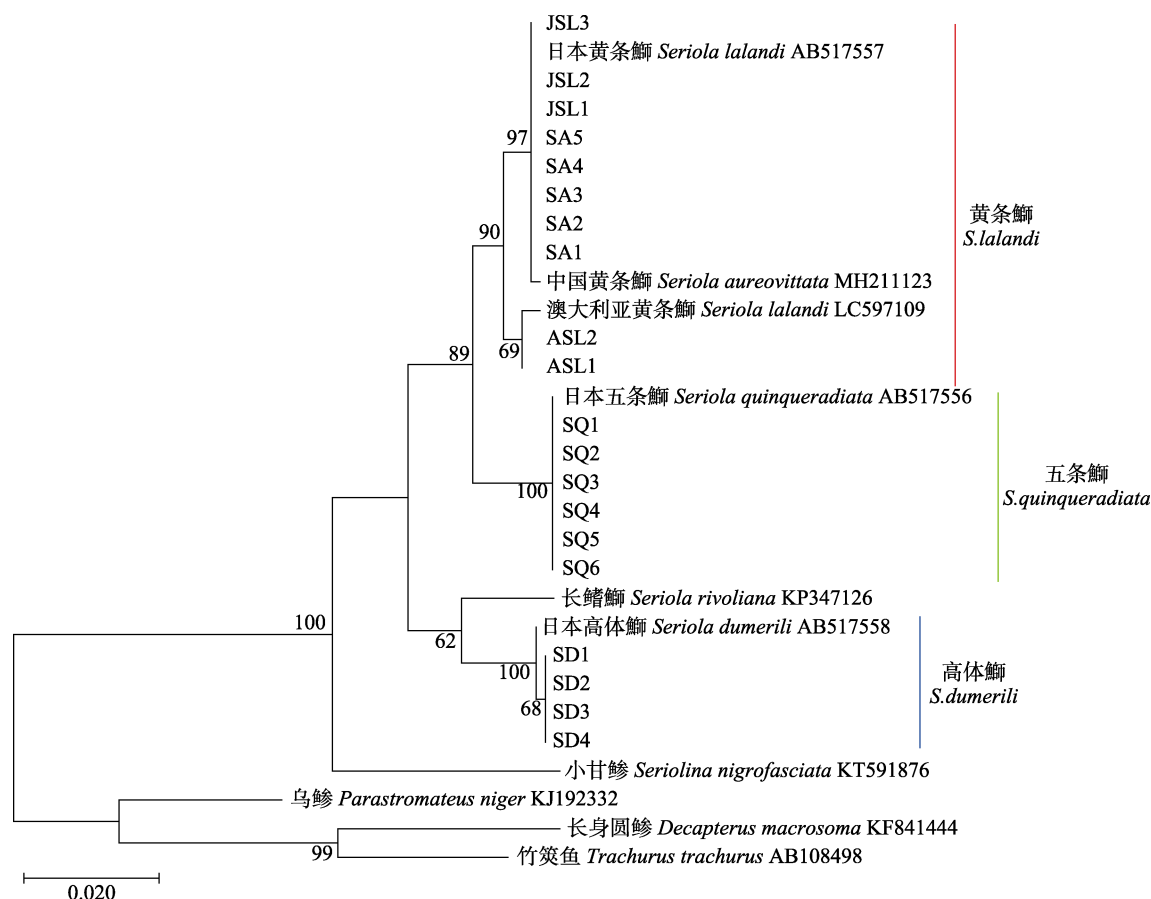


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SQ 为中国五条鲷; SD 为中国高体鲷。节点处数字为置信度值。

Fig. 3 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S Rrna gene

SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia; SQ represents *Seriola quinqueradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.

The number on branch is confidence value

织分化迅速而所选取的标记基因进化速率较慢, 一些变异得不到及时累积而引起^[33-34]。

线粒体 DNA 在检测地理隔离对鱼类群体遗传结构的应用中发挥着重要作用, Premachandra 等^[35]利用基因组测序、线粒体 DNA、微卫星标记分析等方法研究认为太平洋海域的黄条鲷分为三个明显地理隔离的群体, 分别是东北、西北和南太平洋群体, 并且群体间基本不存在基因交流。本研究发现, CO I、CO II 基因能够有效辨识中国与澳大利亚、智利种群的黄条鲷, 对于中国和日本海域黄条鲷不能有效区分, 这与崔爱君^[36]采用 SNP 分子标记、基因组分析的结果一致, 进一步支持了中国与日本黄条鲷可能属于同一群体, 而与澳大利亚、智利黄条鲷种群存在显著的地理隔离。对于不同地理种群的黄条鲷, 16S rRNA 基因

无法有效区分, 与陆键萍等^[37]在金枪鱼群体中研究结果相似。由遗传多样性表明, 16S rRNA 各项参数都是最低的, 变异率仅为 5.06%, 表明其进化速率慢, 遗传物质具有稳定性。CO I 序列的平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数均高于 CO II, 而 CO II 序列的单倍型多样性指数却是三种序列最高的, 表明在鲷属鱼类中 CO I 较 CO II 基因序列变异速度快, 这与鳗鲡属(*Anguilla*)鱼类中规律类似^[38]。将 16S rRNA 与 CO I、CO II 基因结合起来, 可为不同种群黄条鲷的鉴定提供有效的辅助依据。

综上所述, 本研究发现 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列均可作为鲷属鱼类物种鉴定的有效 DNA 条形码。另外, CO I、CO II 可作为不同地理群体黄条鲷的鉴别 DNA 条形码, 而 16S

rRNA 对于不同地理群体的黄条鲷辨识能力不足。在 DNA 条形码应用于物种鉴定或隐藏种分析时,可采用多 DNA 条形码联合验证的方法,以提高技术应用的准确性和可靠性。

参考文献:

- [1] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 479.
- [2] Curole J P, Kocher T D. Mitogenomics: Digging deeper with complete mitochondrial genomes[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, 14(10): 394-398.
- [3] Barrett R D H, Hebert P D N. Identifying spiders through DNA barcodes[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2005, 83(3): 481-491.
- [4] Wang N, Xing R R, Ma C C, et al. Application of DNA barcoding technology for authentication of salmonids[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 232-240. [王楠, 邢冉冉, 马聪聪, 等. DNA 条形码技术在鲑科鱼类真伪鉴别中的应用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 232-240.]
- [5] Lü Y C, Zuo T, Tang Q J, et al. Construction and application of DNA barcoding in sea cucumber Holothurians[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 782-789. [律迎春, 左涛, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 782-789.]
- [6] Sun C, Su Y P, Liu H B, et al. The identification of closely related species and origin of aquatic organisms by molecular approaches[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(3): 53-59. [孙超, 苏彦平, 刘洪波, 等. 水生生物近缘种和产地的分子生物学判别[J]. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 53-59.]
- [7] Mackie I M, Pryde S E, Gonzales-Sotelo C, et al. Challenges in the identification of species of canned fish[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10(1): 9-14.
- [8] Takeyama H, Chow S, Tsuzuki H, et al. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(6): 1646-1657.
- [9] Bakke I, Johansen S D. Molecular phylogenetics of Gadidae and related Gadiformes based on mitochondrial DNA sequences[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(1): 61-69.
- [10] Balanov A A. On the species composition of fish of the genus *Seriola* (Carangidae) in the northwestern part of the sea of Japan[J]. *Journal of Ichthyology*, 2008, 48(6): 415-421.
- [11] Meng Q W, Su J X, Miao X Z. Systematics of Fishes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 672-673. [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 672-673.]
- [12] Iguchi J, Takashima Y, Namikoshi A, et al. Species identification method for marine products of *Seriola* and related species[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(1): 197-206.
- [13] Wang M, Liu H, Huang H, et al. Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding[J]. *Food Science*, 2015, 36(20): 247-251. [王敏, 刘荭, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用[J]. *食品科学*, 2015, 36(20): 247-251.]
- [14] Lakra W S, Verma M S, Goswami M, et al. DNA barcoding Indian marine fishes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(1): 60-71.
- [15] Wang C H, Li S F. Genetic variability and relationships in mitochondrial DNA CO II gene sequence of red common carps in China[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(11): 1226-1231.
- [16] Shao A H, Zhu J, Chen K, et al. Cloning and sequence analysis of mitochondrial CO II and its connected tRNA in *Takifugu fasciatus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(6): 1-8. [邵爱华, 朱江, 陈葵, 等. 暗纹东方鲀线粒体 CO II 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(6): 1-8.]
- [17] Wang S Y, Shi W, Jiang J X, et al. Applicability of mitochondrial CO I and 16S rRNA gene sequences in species identification of sole fish (Pleuronectiformes: Soleidae)[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2014, 33(3): 57-65. [王淑英, 时伟, 江金霞, 等. CO I 和 16S rRNA 基因序列在鲆科(Soleidae)鱼类种类鉴定中的适用性研究[J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(3): 57-65.]
- [18] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL[J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 329-356.
- [19] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [20] Qiao H Y. Phylogeny of Schizothoracinae fishes and genetic structure of *Pampus argenteus* population based on mitochondrial DNA sequences[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 16-17. [乔慧莹. 基于线粒体基因序列分析裂腹鱼亚科的系统进化关系及中国沿海银鲈群体的遗传结构[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 16-17.]
- [21] Zhao K. Mitochondrial DNA (mtDNA) of fish and application in molecular phylogenetic[J]. *Journal of Qinghai University (Nature Science)*, 2006, 24(2): 49-53. [赵凯. 鱼类线粒体 DNA(mtDNA)及其在分子系统学中的应用[J]. *青海大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(2): 49-53.]

- [22] Šegvić-Bubić T, Marrone F, Grubišić L, et al. Two seas, two lineages: How genetic diversity is structured in Atlantic and Mediterranean greater amberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810 (Perciformes, Carangidae)[J]. Fisheries Research, 2016, 179: 271-279.
- [23] Shao H G, Zhang Y P, Ke X, et al. *Cryptopygus nanjiensis* mitochondrial CO II gene sequence and molecular evolution of wingless insects[J]. Science in China (Series C), 2000, 30(3): 330-336. [邵红光, 张亚平, 柯欣, 等. 南极隐鲱线粒体 CO II 基因序列及无翅类昆虫分子进化[J]. 中国科学 (C 辑), 2000, 30(3): 330-336.]
- [24] Chen F S, Wei Z J, Li Q B, et al. Molecular characterization of the cytochrome oxidase subunit II gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm *Samia cynthia ricini*[J]. Acta Sericologica Sinica, 2004, 30(1): 38-43. [陈复生, 魏兆军, 李庆宝, 等. 蓖麻蚕线粒体 *cox2* 基因的克隆、序列测定和分子系统学分析[J]. 蚕业科学, 2004, 30(1): 38-43.]
- [25] Craig M T, Pondella D J II, Franck J P C II, et al. On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 19(1): 121-130.
- [26] Meng Z N, Zhuang Z M, Ding S X, et al. Sequence variation and molecular phylogeny of mitochondrial 16S rRNA genes in eight species of Sciaenidae from offshore China[J]. Progress in Natural Science, 2004, 14(5): 514-521 [蒙子宁, 庄志猛, 丁少雄, 等. 中国近海 8 种石首鱼类的线粒体 16S rRNA 基因序列变异及其分子系统进化[J]. 自然科学进展, 2004, 14(5): 514-521.]
- [27] Liu S F, Chen L L, Dai F Q, et al. Application of DNA barcoding gene CO I for classifying family Sciaenidae[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(2): 223-232. [柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.]
- [28] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [29] Jiang L X, Zhang J C, Fan G Z, et al. DNA barcoding and molecular systematics of Notothenioidei[J]. Journal of Fishery Sciences of China, (2021-05-11). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20210511.0951.002.html>. [姜郦轩, 张吉昌, 樊钢洲, 等. 南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码及分子系统学[J]. 中国水产学, (2021-05-11). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20210511.0951.002.html>.]
- [30] Huang Y. Molecular Phylogenetics: Principle, Method and Application[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 70-76. [黄原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 70-76.]
- [31] Zheng W J, Zhu S H, Zou J X, et al. Molecular phylogenetic relationship of Carangidae based on partial sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 847-854. [郑文娟, 朱世华, 邹记兴, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨 12 种鲹科鱼类的分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 847-854.]
- [32] Liu J, Cao J B, Liu C L, et al. Relationship analysis and species identification of three common pomfrets using mitochondrial CO III gene[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2018, 33(6): 20-26, 72. [刘军, 曹佳宝, 刘彩玲, 等. 线粒体 CO III 基因分析三种常见鲷鱼的亲缘关系[J]. 天津科技大学学报, 2018, 33(6): 20-26, 72.]
- [33] Chen S H, Qu Y J, Li J E. Mitochondrial DNA and its progresses in fish[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(3): 13-20. [陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(3): 13-20.]
- [34] Shadel G S, Clayton D A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 409-435.
- [35] Premachandra H K A, la Cruz F L D, Takeuchi Y, et al. Genomic DNA variation confirmed *Seriola lalandi* comprises three different populations in the Pacific, but with recent divergence[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 9386.
- [36] Cui A J. Study on the population genetics of the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 5-6. [崔爱君. 黄条鲷种群遗传特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 5-6.]
- [37] Lu J P, Yao L, Xin H M, et al. Applicability analysis of mitochondrial CO I, Cyt b and 16S rRNA genes in identification of six tuna species[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 73-81. [陆键萍, 姚琳, 信红梅, 等. 线粒体 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 73-81.]
- [38] Gong X L, Yue L J, Cui Z K, et al. The sequencing analysis and taxonomic effectiveness of *Anguilla* six eels based on mtDNA CO I and CO II gene sequence[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(4): 524-530. [龚小玲, 岳丽佳, 崔忠凯, 等. 鳗鲡属 6 种鱼类线粒体 CO I 和 CO II 基因序列分析和分类的有效性[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4): 524-530.]

Species identification and phylogenetic relationships in *Seriola* based on DNA barcoding

WANG Kaijie^{1,2}, XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou¹, CUI Aijun¹, JIANG Yan¹, WANG Bin¹, FANG Lu¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Qingdao 266071, China;
2. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: *Seriola* has three species that are highly similar morphologically and are difficult to distinguish. Therefore, it is necessary to distinguish them by molecular biology methods. In this study, we explored the applicability of cytochrome oxidase subunit I (CO I), cytochrome oxidase subunit II (CO II), and 16S rRNA in identification and evolutionary analysis of the three species of *Seriola*, namely, *S. lalandi* (Chinese, Australian and Japanese populations), *S. dumerili*, and *S. quinqueradiata*. Three pairs of primers were designed for PCR amplification and sequencing of CO I, CO II, and 16S rRNA sequences of the three *Seriola* species. Dnasp5.10 and Mega7.0 software were used for DNA sequencing, genetic difference analysis, and phylogenetic tree analysis. The results showed that the CO I, CO II, and 16S rRNA sequences had a significant A+T bias. The mitochondrial 16S rRNA sequence was the most conservative, with a variation rate of 5.06%. The average number of nucleotide differences (k) and nucleotide diversity (P_1) according to the CO I sequence were higher than those of CO II and 16S rRNA. CO II had the highest haplotype diversity index among the three genes, indicating its high genetic diversity. The CO I sequence had higher differentiation and more abundant genetic resources than the 16S rRNA and CO II sequences. Thus, CO I and CO II sequences could be used to identify the three *Seriola* species in China and effectively identify the populations of *S. lalandi* from the three different waters (Northeast, Northwest and South Pacific waters). In the *Seriola* species, the interspecific genetic distances of CO I and CO II were more than 10 times the intraspecific genetic distances. The phylogenetic tree analysis showed that each species had independent branches. *S. lalandi* and *S. quinqueradiata* had a closer relationship than the others in the tree. The phylogenetic tree constructed using the three gene sequences could reflect the evolutionary relationship among the species. These results indicated that CO I and CO II gene sequences could be used as effective DNA barcodes for species identification and population division of *Seriola* species and provide efficient molecular tools for classification identification, resource screening, and diversity protection.

Key words: *Seriola* species; DNA barcoding; genetic distance; phylogenetic tree

Corresponding author: XU Yongjiang. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn